

下垂体特異的ホメオティック因子 Prop-1 はホルモン産生細胞の運命を決定するか

加 藤 幸 雄

Pituitary Specific Homeobox Transcription Factors PROP1: Role in Differentiation of Hormone-producing Cells

Yukio Kato

下垂体は、生殖や成長にかかわるホルモンを特定の細胞で合成する内分泌器官であり、生体の機能調節に重要な役割を果たしている。下垂体は、一連の分化を経て5種類のホルモン産生細胞で構成されることになる。そこにはホルモンごとに特異的分子の出現により分化が進行するプログラムが存在し、その過程で形成されるホルモン遺伝子の発現制御系は成熟後における視床下部や標的器官の作り出すさまざまな情報に対する特異な応答機構である。下垂体ホルモンのなかで、特に、性腺刺激ホルモン FSH β 鎖遺伝子に焦点をあてて進めてきたこれまでの転写因子の研究成果の上に立って、本課題を設定した。そこでは、これまで手がけてきた下垂体特異な転写因子 PROP1 が、ホルモン遺伝子の制御因子であるばかりでなく、下垂体の発生分化に深くかかわる可能性があることから、「下垂体特異的ホメオティック因子 Prop-1 はホルモン産生細胞の運命を決定するか」と、研究対象を絞り込んだ。

こうした背景から、研究1年目では、下垂体の発生過程での発現時期を解析して新知見を得たが、2年目の2009年度は、出生後の PROP1 の局在とホルモン産生細胞における存在を中心に解析した。

1. 実験方法

1. 1 PROP1 抗体

PROP1 抗体は、昨年度に TrxA-His-タグ融合組換え体 PROP1 C-末端部 126-223 残基を用いてモルモットに免疫して作製した抗体を使用した。

1. 2 免疫組織化学

ラット(r)下垂体周辺部の $10\mu\text{m}$ の凍結切片を4%パラホルムアルデヒドで固定後、作製した PROP1 抗体をはじめ各種抗体で染色した。rPIT1 (1:250 希釈)、rPROP1 (1:8000), rPIT1 (1:250), ウシ S-100 (1:100), ヒト SOX2 (1:500), ヒツジ

LH β (1:2000), rTSH β (1:2000), rGH (1:8000 dilution), rPRL (1:1500), ヒト ACTH (1:1000) を用い、蛍光標識二次抗体により組織観察を行った。

2. 実験および結果

2. 1 出生直前と生後のラット下垂体における PROP1 陽性細胞の局在の免疫組織化学

昨年度に作製した抗体を用いて、出生直前から生後にかけてのラット下垂体について PROP1 の教区剤を免疫組織化学的に調べた(図1)。胎児期の E18.5、PROP1 陽性細胞は Marginal Cell Layer に局在して

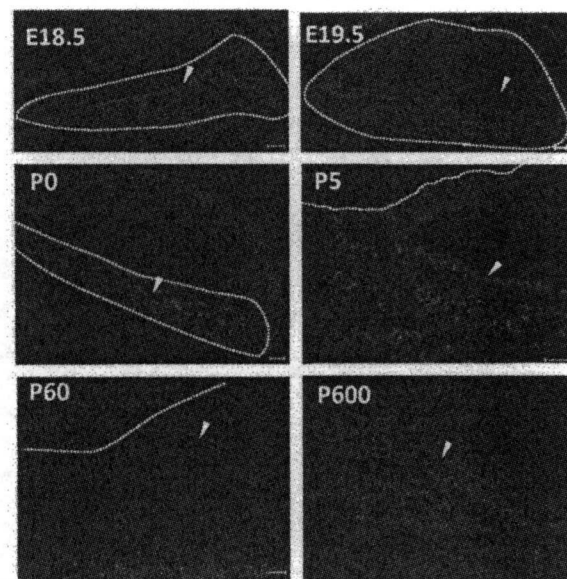


図1. 出生直前と生後のラット下垂体における PROP1 陽性細胞の局在の免疫組織化学。出生直前の P18.5 および P19.5、出生時 (P0)、出生後の P5、P60、P600 を調べた。点線は下垂体と他の組織との境界と示している。矢頭は、下垂体前葉と中葉との境界で Marginal Cell Layer 部を示した。青は DAPI 染色像で核の存在を示す。赤は、PROP1 抗体陽性の細胞核を示している。

いたが、出生直前の E19.5 では下垂体前葉実質に層状に局在していた。出生に伴い、PROP1 陽性細胞の局在は大きく変化していた。出生時 (P0) および P5 では Marginal Cell Layer の局在がさらに減じて実質の存在の頻度と変わりなくなる。P60 および P600 では、依然として Marginal Cell Layer に PROP1 陽性細胞が存在するもののその数は少なく、実質での頻度も著しく減少していた。

2. 2 生後における PROP1 陽性細胞とホルモン産生細胞の関係について

昨年度の実験で、胎児期に PROP1 がホルモン産生細胞に存在するかを調べてみたがホルモンとの共存は確認できなかった。そこで、生後についても再度調べてみた。

その結果、図 2 に示したように、PRL、GH、ACTH、TSH β 、LH β 、 α のいずれの抗体陽性細胞と PROP1 陽性細胞は重なることは無かった。従って、PROP1 はホルモン産生細胞の分化決定の重要な因子であるにもかかわらず、ホルモン産生細胞には存在しないと結論した。

2. 3 PROP1 陽性細胞の同定

前項の実験結果は PROP1 が非ホルモン産生細胞に存在することを示唆している。下垂体における非ホルモン産生細胞として同定されているのは濾胞星状細胞である。その細胞には、S100 タンパク質が特異

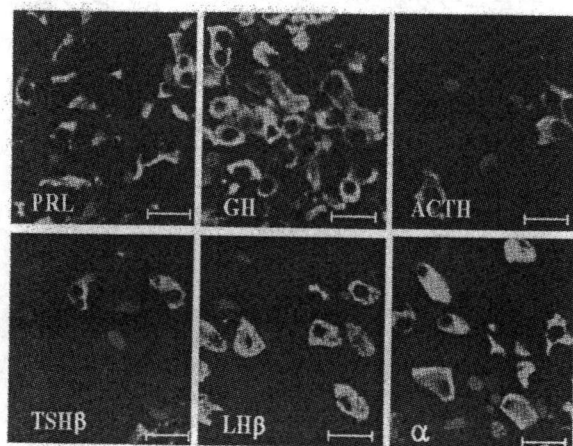


図 2. 下垂体 60 日齢の組織を PROP1 抗体とホルモン抗体 (PRL、GH、ACTH、TSH β 、LH β 、 α) を用いて免疫組織化学を行った。緑がそれぞれのホルモン抗体を用いた陽性像で、細胞質が染まっている。赤は PROP1 陽性の核である。

的な存在を示すことが知られている。そこで、PROP1 と S100 タンパク質についてその共存の有無を免疫組織化学的に調べた (図 3)。

その結果、PROP1 は S100 陽性細胞に存在することが判明した。しかし、PROP1 のすべてが S100 陽性細胞ではないこと、また、S100 陽性細胞のすべてが PROP1 陽性でないことが同時に判明した。

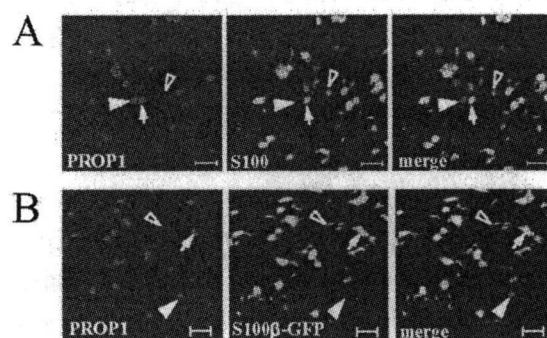


図 3. PROP1 陽性細胞の同定。正常ラット (A) と S100 プロモーターを GFP タンパク質遺伝子に連結したキメラ遺伝子を導入して作製した S100TG ラット (B) 下垂体を用いて PROP1 および S100 抗体による免疫組織化学を行った。PROP1 陽性の核 (左: 赤)、S100 陽性細胞 (中: 緑)、PROP1 と S100 免疫像を重ねたもの (右: 黄色は PROP1 と S100 染色が重なったもの)。白い矢頭は PROP1 のみが陽性、透明な矢頭は S100 のみが陽性、矢印は PROP1 と S100 がいずれも陽性なもの。

2. 4 PROP1 と非ホルモン産生細胞の不均一性

そこで、S100TG ラットを用いて、PROP1 と S100 の陽性細胞の分布を調べることにした。その際、昨年の実験で PROP1 明らかとなった細胞分化のマーカー因子で PROP1 陽性細胞に常に共存する SOX2 について、その免疫染色を加えた免疫組織化学を行った。



図 4. S100TG ラット下垂体を用いた PROP1、SOX2 の組織化学。PROP1 (赤)、S100 (青)、S100 遺伝子プロモーター異存に発現する GGP 蛍光細胞 (緑) をそれぞれ示した。右端は 3 つの像を重ねたもので、番号をつけた細胞は以下の様になる。1 : SOX2 のみに陽性, 2 : SOX2 と PROP1 に陽性, 3 : SOX2、PROP1、S100 に陽性、4 : SOX2 と S100 に陽性, 5 : S100 のみに陽性。

その結果 (図 4)、SOX2、PROP1、S100 の 3 種のタンパク質が存在する細胞には、5 種の組み合わせの細胞種があり、いずれのタンパク質についても不均一な細胞種で構成されていることが判明した。

3. 考察

Prop-1 は、下垂体のホルモン合成の機能を強く支配する転写因子である。この因子の遺伝子の点突然変異は、遺伝的に矮小化を示す Ames マウスの原因でとなっており、胎児期では確認できなかった PROP1 がホルモン産生細胞に共存するか否かなど、さらに本年の研究で解析を展開した。

本年度の研究で、PROP1 陽性細胞は胎児期の局在を大きく変え、生後の性成熟期では Marginal Cell Layer の局在が著しく減少し、前葉実質での頻度も大きく減少することを初めて明らかにした。Marginal Cell Layer は、下垂体の幹細胞が存在すると予想する研究が多く、出生を境に PROP1 の存在場所が著しく変化することは、胎児期と生後で PROP1 が有する機能が大きく変化することを想像させる。

また、どの時期を通じて、PROP1 はホルモン産生細胞に存在しないことも判明した。従って、PROP1 がホルモン産生細胞分化に重要な因子であること、細胞分化マーカー SOX2 と常に共存することから、PROP1 は胎仔期初期のホルモン産生細胞分化に働き、生後はホルモン産生細胞を供給する下垂体プロジェニター細胞の機能維持に働くものと考えられる。こうした考えは、PROP1、SOX2、S100 の陽性細胞がそれぞれに不均一な細胞群によって構成される、三者の組み合わせが 5 種になることから、予想できることである。今後、PROP1 の標的遺伝子を同定すること、胎児期と生後における役割の違いを解明すること、PROP1 機能の解明のために PROP1 を持続的に発現する株化細胞の樹立などを目指す。

2009年度の業績

原著論文

- [1] Susa T, Ishikawa A, Cai LY, Kato T, Matsumoto K, Kitahara K, Kurokawa R, Ono T, Kato Y, Highly related LIM factors, LMO1, LMO3 and LMO4, play different roles in the regulation of pituitary glycoprotein hormone common α subunit gene. *Biosci Rep* 30 (2010) 51-58.
- [2] Yoshida S, Kato T, Susa T, Cai L-Y, Nakayama

M, Kato Y, PROP1 coexists with SOX2 and induces PIT1-commitment cells. *Biochem Biophys Res Commun* 385 (2009) 11-15.

- [3] Susa T, Ishikawa A, Kato T, Nakayama M, Kitahara K, Kato Y, Regulation of porcine pituitary glycoprotein hormone alpha subunit gene with LIM-homeobox transcription factor Lhx3. *J Reprod Dev* 55 (2009) 425-432.
- [4] Susa T, Ishikawa A, Kato T, Nakayama M, Kato Y, Molecular cloning of paired related homeobox 2 (Prx2) as a novel pituitary transcription factor. *J Reprod Dev* 55 (2009) 502-511.
- [5] Nakayama M, Kato T, Susa T, Sano A, Kitahara K, Kato Y, Dimeric PROP1 binding to diverse palindromic TAAT sequences promotes its transcriptional activity. *Mol Cell Endocrinol* 307 (2009) 36-42.
- [6] Kato Y, Kimoto F, Susa T, Nakayama M, Ishikawa A, Kato T, Pituitary homeodomain transcription factors HESX1 and PROP1 form a heterodimer on the inverted TAAT motif. *Mol Cell Endocrinol* 315 (2009) 168-173.
- [7] Ishikawa A, Susa T, Kato T, Sano A, Kato Y, Molecular cloning and characterization of porcine homeodomain transcription factor Msx1. *J Reprod Dev* 55 (2009) 278-282.

総説

1. 蔡立義、加藤たか子、加藤幸雄. トランスジェニック動物を用いたゴナドトロピン遺伝子下垂体組織特異的発現制御の解析. 明治大学農学部研究報告 59 (2009) 1-8.
2. 加藤幸雄、石川晶雄、加藤たか子. 下垂体の発生分化とホルモン遺伝子制御のシグナル・転写因子ネットワーク. 明治大学農学部研究報告 59 (2009) 21-30.

著書

1. 加藤幸雄、加藤たか子. 下垂体腫瘍の実験モデル、(「下垂体腫瘍のすべて」寺本明・長村義之編、医学書院) : 78-84 (2009)

その他 海外 3 件・国内発表 18 件の計 21 件の学会発表を行った。そのなかで、第 24 の日本下垂体研究会で、石川晶雄 (M1) と望月万里江 (M1) が、最優秀賞と優秀発表賞を受賞した。また、学振特別研究員の諏佐崇生博士が第 36 回日本神経内分泌学会学術集会で若手研究奨励賞を受賞した。